Dott S. DESSY
Direttore nell'Istituto d'igiene sperimentale per la Provincia di Buenos-Aires

INTORNO ALLA PREPARAZIONE

DEL VACCINO E DEL SIERO ANTIPESTOSO

CON IL METODO LUSTIG-GALEOTTI

NEL NOSTRO ISTITUTO D'IGIENE

ESTRATTO
dal periodico Il **"Morgagni"** *N. 9 - 1901*

MILANO
SOCIETÀ EDITRICE LIBRARIA
Via Disciplini, 15 - Gall. De Cristoforis, 54
1901

Dott. S. DESSY

Direttore nell'Istituto d'igiene sperimentale per la Provincia di Buenos-Aires

INTORNO ALLA PREPARAZIONE

DEL VACCINO E DEL SIERO ANTIPESTOSO

CON IL METODO LUSTIG-GALEOTTI

NEL NOSTRO ISTITUTO D'IGIENE

ESTRATTO

dal periodico Il " Morgagni „ *N. 9 - 1901*

MILANO

SOCIETÀ EDITRICE LIBRARIA

Via Disciplini, 15 - Gall. De Cristoforis, 54

1901

Circa la fine del 1896 due valenti colleghi italiani, il prof. LUSTIG e GALEOTTI, avevano ottenuto di estrarre dal corpo del bacillo di KITASATO-YERSIN, una sostanza chimica ben caratterizzata, che inoculata agli animali da esperimento conferiva loro una valida immunità contro dosi mortali di culture virulente di peste.

Inoculando dosi progressive di questa sostanza, convenientemente disciolta, al topo, al coniglio ed al cavallo, si otteneva un siero dotato di potere curativo e preventivo specifico. Volendo esperimentare praticamente il siero ed il vaccino da loro preparato, andarono in India nel tempo che la terribile malattia vi faceva grande strage, e ottennero dall'uso terapeutico del loro siero resultati così soddisfacenti che per iniziativa del dott. WEIR, capo dell'ufficio sanitario del municipio, e dal dott. CHOKSEY, direttore dell'ospedale Arthur Road, il municipio di Bombay fondò un istituto speciale per la preparazione di questo siero. Questo istituto fu diretto primieramente dal dott. GALEOTTI e poi dal dott. POLVERINI il quale seguita anche oggi in questa direzione.

L'anno decorso, secondo quello che mi comunicò il dottore POLVERINI, teneva in trattamento 18 cavalli che non erano sufficienti a somministrare la quantità di siero necessaria durante le grandi epidemie, nemmeno per la città di Bombay solamente.

Essendosi nell'anno decorso ed in questo manifestati alcuni casi di peste in questa Provincia, io fui incaricato dalla Direzione generale della sanità pubblica di preparare vaccino e siero antipestoso.

Si lasciò, come era naturale, assolutamente al mio criterio la scelta del metodo il più adatto per raggiungere il desiderato scopo. Dopo aver preparato una certa quantità di vaccino col metodo Haffkine, e dopo aver così constatato colla pratica che non è possibile ottenere una composizione costante per il diverso svolgimento o sviluppo che con tutti i microbi e più che altro con quello della peste si ottiene nei palloni di culture quantunque siano di una medesima composizione e sementa, il che rende impossibile di calcolare nemmeno approssimativamente la quantità di principio attivo contenuta nella unità di volume, ricorsi al metodo Lustig-Galeotti di facile e non pericolosa esecuzione, e mi sembrò nella pratica tanto razionale e fecondo di buoni resultati che non volli adottar altro per la preparazione del vaccino antipestoso.

Ecco qui in poche parole come preparo il detto vaccino. Seguendo esattamente la serie di manipolazioni che vengo ad esporre, può dirsi che non vi è pericolo nè per il preparatore nè per l'assistente.

In un pallone di brodo di peptone si semina un poco di cultura virulentissima di peste, si coltiva per 48 ore, in capo alle quali, dopo aver constatato coll'esame microscopico se la cultura è pura, si seminano con questa i recipienti che contengono l'agar.

Ho usato invece delle scatole di Petri, o dei tubi larghi di cultura adoperati da Lustig-Galeotti le bocce comuni da spirito che si possono avere ad un prezzo molto basso e che resistono perfettamente alla sterilizzazione con l'autoclave. In ogni bottiglia si versano 200 grammi di agar-peptone glicerinato al 2 per 100, si sterilizza a due atmosfere e dopo si lascia raffreddare ponendole orizzontalmente in maniera che l'agar si solidifichi sopra una delle quattro faccie.

Si ottiene così una vasta superficie di cultura chiusa in un recipiente solido, che non può, come succede nelle scatole di Petri, inquinarsi per il contatto dell'aria, nemmeno dopo molto tempo di permanenza nelle stufe. Queste bottiglie si seminano con le culture in brodo già rammentate per mezzo di una pipetta

a palla (ballon-pipetta) di MIQUEL. Per evitare il pericolo che sopravverrebbe se cadesse una goccia di cultura nel momento della sementa, la pipetta a palla è assicurata ad un sostegno speciale sopra una gran capsula o catinella di porcellana o di vetro contenente una soluzione di bicloruro di mercurio al 5 per 100.

Nel tubo superiore della pipetta a palla si pone un tubo di gomma chiuso con una pinzetta di pressione.

Si riempie la pipetta accostandovi il pallone di cultura e inclinando finchè la punta della medesima possa assorbire il liquido in quello contenuto. Si aspira con la bocca a mezzo del tubo di gomma e quando la pipetta è piena, si stringe la pinza di pressione. In questo modo nemmeno una sola goccia di cultura può cadere dalla punta o becco della pipetta, e se pur ciò accadesse, i bacilli che essa contiene incontrerebbero una sicura e pronta morte nella soluzione di sublimato della capsula o catinella sottostante.

Un assistente accosta alla pipetta ad una per volta le bottiglie da spirito in maniera che la punta o becco di quella, senza toccare la parete del collo di queste, penetra profondamente fino al livello dell'agar; aprendo allora la pinzetta di pressione si lasciano cadere alcune goccie di cultura, si serra la pinzetta, si leva la bottiglia e si volge in tutti i versi in modo che la sementa si effettui sopra tutta la superficie dell'agar, e si pongono dopo seminate nella stufa a 37° per quattro giorni. Per evitare il pericolo di rottura io feci costruire grandi scatole di legno con coperchio larghe e basse e verniciate nella loro parte interna ed esterna, ognuna delle quali contiene 15 bottiglie disposte in una sola fila e separate fra loro da una lista di legno intermedia. Queste cassette si chiudono con chiave e si collocano così disposte nella stufa. Resta evitato in tal modo il pericolo di rottura, che se pur avvenisse non porterebbe conseguenze essendo le casse solidissime e adatte a mettervi dentro disinfettante in quantità sufficiente. Consiglio a chi volesse o dovesse far queste culture di seminare in una volta sola una grande quantità di bottiglie, 100 o 200, perchè, come vedremo, potendosi conservare il vaccino allo stato secco per molto tempo senza che perda le sue proprietà immunizzanti non sarebbe logico esporsi ad ogni momento al pericolo, per quanto remoto, di simili preparazioni.

Dopo quattro giorni lo strato microbico è nel suo pieno

ed intero sviluppo e si può addivenire alla preparazione del vaccino.

Si versano a questo scopo, in ogni bottiglia di cultura, circa 25 c.c. di soluzione d'idrato di potassio caustico al 10 per 1000 e si fa correre bene questo liquido sopra la cultura agitando in ogni verso, finchè questo si stacchi completamente dal mezzo nutritivo e si mescoli con l'idrato di potassio.

Si lascia così per circa 20 minuti, tempo sufficiente a sciogliere completamente lo strato microbico ed a trasformarlo in una massa mucilagginosa simile a chiaro d'uovo.

Si versa la massa mucilagginosa formatasi in grandi vasi di vetro sterilizzati (1) contenenti due o tre litri di acqua sterilizzata e debolmente acidulata con acido cloridrico 1/2 o 1 per 100, agitando continuamente allo scopo di disgregarla. Si noterà subito la formazione di numerosi e piccoli fiocchi bianchicci che si precipitano rapidamente. Si seguita così aggiungendo le culture disciolte e verificando di tanto in tanto la reazione che deve mantenersi acida fino alla fine, perchè se diviene alcalina la massa mucilagginosa si scioglie senza precipitare.

In tre litri di soluzione cloridrica all'1 per 100 soglio versare il contenuto di venti bottiglie di spirito. Si lascia depositare il precipitato formatosi, il che richiede circa quattro ore: si aspira delicatamente tutto il liquido superiore senza agitare il precipitato: si riscioglie in un poco di soluzione potassica, si filtra per cotone sterilizzato, raccogliendo il liquido filtrato in un recipiente contenente 2 o 3 litri di soluzione cloridrica al 1/2 per 100. Si lascia depositare, si aspira nuovamente tutto quello che si può del liquido superiore e si raccoglie il precipitato sopra un filtro di carta sterilizzata. Eliminata la maggior parte dell'acqua si raccoglie con una spatola sterilizzata il precipitato di sopra al filtro e lo si mette a seccare, in una scatola di vetro sterilizzata, nel vuoto e sopra acido solforico. Il vaccino così essiccato si presenta sotto forma di squamme, di aspetto vetrino giallognolo che si polverizza facilmente e conserva indefinitamente le sue proprietà caratteristiche se si conserva perfettamente secco ed all'oscuro.

(1) Sono ottimi per questo uso i vasi comuni da prugne che si sterilizzano nell'autoclave frapponendosi fra il tappo di metallo e la bocca del vaso un involucro di cotone.

Ho ripetuto tutte le ricerche chimiche fatte da LUSTIG e GALEOTTI e sono d'accordo con questi esperimentatori nel credere che la sostanza che si estrae nel modo indicato dal bacillo KITASATO-YERSIN è un nucleo-proteico. La caratterizzano come tale le seguenti proprietà e reazioni. Si scioglie nei liquidi alcalini formando soluzioni opaline semi-opache che non si coagulano col calore e che precipitano con gli acidi minerali e con l'acido acetico diluiti. Con l'acido nitrico dà un precipitato che all'ebollizione si colora leggermente in giallo: con l'acido tannico dà un precipitato giallo; con la potassa ed il solfato di rame dà un precipitato castagno-scuro: filtrando o lasciando depositare questo precipitato non si osserva nel liquido la reazione del biureto. Con l'acido solforico (10 per 100) in caldo per un'ora, neutralizzando dopo con NH^3 e aggiungendo soluzione ammoniacale di nitrato si ottiene, in capo ad alcune ore, un precipitato copioso, fronzuto, che non si otterrebbe se dopo l'acidulazione con acido solforico si neutralizza senza precedentemente scaldare. Per digestione durante 8-10 ore si ha un residuo insolubile e la formazione di un peptone. Incenerendo e trattando la soluzione nitrica delle ceneri con molibdato d'ammonio si ha la reazione del fosforo. Infine, inoculando una soluzione di questa sostanza in carbonato di sodio al 1/2 per 100 nelle vene degli animali ordinarii da esperimento si produce in questi la morte per coagulazione intravascolare del sangue (prova dell'HALLIBURTON).

Questo nucleo proteide rappresenta e contiene in sè il principio attivo della peste. Difatti inocolando una piccola quantità, negli animali sensibili all'azione del bacillo di KITASATO-YERSIN conferisce loro una valida immunità, che dura certamente più di due mesi e che permette loro di sopportare, senza nessun rischio, la successiva iniezione di varie dosi mortali di cultura viva: se la dose della cultura inoculata è molto grande, gli animali vaccinati muojono a distanza grande dai controlli.

Come esempio servano le seguenti esperienze da me fatte in una delle quali confrontai il vaccino preparato con il metodo LUSTIG-GALEOTTI con quello preparato dal dipartimento nazionale d'igiene col metodo HAFFKINE (V. prospetto pag. seguente)

Nella cavia N. 5 il bacillo esistente nell'essudato peritoneale aveva sofferto alterazioni degenerative gravissime ed aveva debole vitalità.

Le esperienze circa il potere preventivo di queste due vacci-

nazioni non si sono per anco terminate e le riferiremo in altra pubblicazione.

Prima di parlare della preparazione del siero, voglio ricordare che con il bacillo HAFFKINE e quello preparato da me col metodo LUSTIG-GALEOTTI sono state inoculate circa 800 persone fra operai ed impiegati della dogana negli scali (*embarcaderos*) di S. Nicola, dove, come si sa, si erano manifestati varii casi di peste bubbonica.

Cavia	Vaccino	Data della vaccinazione	Cultura di peste iniettata nel peritoneo	Data della inoculaz. della cultura	Resultato
N. 1	mgr. 5 L.-G.	6 dic. 1899	mezza ansa	30 dic. 1899	sopravvive
» 2	» 3 »	6 id. id.	»	»	»
» 3	controllo	—	»	»	muore il 3 gennaio
» 4	»	—	»	»	»
» 5	mgr. 5 L.-G.	22 febb. 1901	1 cmc. di cultura in caldo da 20 giorni	8 marzo 1901	muore 5 giorni dopo
» 6	» 2$^1/_2$ »	»	»	»	» 33 ore dopo
» 7	cmc. 5 HAFFKINE	»	»	»	» 30 » »
» 8	cmc. 1 HAFFKINE	»	»	»	» 18 » »
» 9	controllo	—	»	»	» 18 » »
» 10	»	—	»	»	» 18 » »

Secondo le istruzioni del dipartimento nazionale d'igiene che prepara il vaccino HAFFKINE, quest'ultimo fu inoculato con scopo preventivo nelle dosi di 1 cmc., mentre che per quello LUSTIG-GALEOTTI ho consigliato la dose di 5 milligr. sciolta in 2 cmc. di soluzione di carbonato sodico e cloruro sodico aa. 0,50 per 100. È probabile che la dose di 1 cmc. di vaccino HAFFKINE possa preservare l'uomo perchè mai questo si infetti con la enorme quantità di microbi esistenti in 1 cmc. di cultura in brodo; non ostante debbo ricordare che GOTSCHLICH con dosi di meno di 1 cmc. di vaccino HAFFKINE non riuscì a preservare gli animali di esperimento contro $^1/_{10}$ di ansa di cultura di peste; con queste dosi si ritardò la morte in confronto dei controlli. Però, fondandomi

sulle esperienze fatte da me fino ad oggi, deduco che il potere preservativo del vaccino Lustig-Galeotti nei limiti delle dosi che s'iniettano nell'uomo è molto superiore a quello del vaccino Haffkine, il che facilmente si capisce quando si consideri il modo di preparazione dei due vaccini.

Il fatto dunque che il vaccino Lustig-Galeotti può dosarsi esattamente allo stato secco e che è scevro da ogni pericolo lo rende superiore a quello di Haffkine, e dovrà preferirsi sempre nella profilassi della peste.

Nella recente epidemia di S. Nicola, che sarà oggetto di una mia prossima pubblicazione, sono state inoculate con il vaccino Lustig-Galeotti circa 600 persone; con quello di Haffkine circa 200 con dosi di 5 mg. e di 1 cmc. rispettivamente. Le inoculazioni si facevano sulla regione esterna del braccio: i fenomeni di reazione locale e generale erano molto imponenti col vaccino Lustig-Galeotti, e quasi nulli, eccettuato in un caso, col vaccino Haffkine.

Queste vaccinazioni unite alle altre misure profilattiche combatterono con efficacia l'epidemia, e sono d'accordo con Haffkine che la vaccinazione è una eccellente arme contro la peste senza che ciò implichi il disconoscere la importanza delle altre misure sanitarie.

Per quanto si osservi molto l'asepsi e l'antisepsi nel luogo della inoculazione si forma un piccolo edema non molto visibile, che in pochi casi dal luogo dell'inoculazione scende fino al gomito. L'individuo inoculato dopo poche ore si sente un poco di malessere e stanchezza generale sufficientemente accentuata: in qualche caso si osservò anche il vomito e la diarrea: spesso cefalea e passeggiera elevazione termica che dura generalmente poche ore. Molto spesso le persone inoculate dicevano al medico il giorno successivo alla iniezione: « la notte scorsa sono stato molto male e credevo di morire, oggi tutto è passato e mi sento perfettamente bene ».

Tuttavia, non tenendo conto di ciò che vi può essere di esagerato in questa manifestazione, si può dire che la reazione generale col vaccino Lustig-Galeotti è abbastanza intensa.

Trascrivo il resultato di due osservazioni fatte sopra due dementi dell'ospedale Mechor Romero:

N. N., inoculata alle 8 ant. con 3 mgr. vaccino LUSTIG-GALEOTTI.

10 ant.	Temp. 37.5	Pulsaz.	90
6 pom.	» 38.2	»	100
11 ant.	» 37.8	»	101
6 pom.	» 37.1	»	90

N. N., inoculata alle 8 ant. con 5 mgr. di vaccino LUSTIG-GALEOTTI.

10 ant.	Temp. 37.8	Pulsaz.	102
6 pom.	» 38.0	»	101
11 »	» 38.6	»	108
11 ant.	» 37.2	»	90
6 pom.	» 37.2	»	90

Nelle due osservate si manifesta edema un poco doloroso nel punto dell'inoculazione.

Per ottenere un siero attivo necessitano per lo meno 5 iniezioni di vaccino. Si scioglie questo in Na Cl e $Co Na^2$ aa. 50 %; la quantità di solvente deve essere abbondante per evitare che la reazione locale sia troppo intensa. Sciolgo il vaccino nella soluzione alcalina in proporzione di uno per mille. La prima inoculazione sarà di 50 centigr. di solvente; l'animale reagisce in un modo molto intenso: localmente si produce un edema imponente che si stende fino in basso, e si riassorbe con una certa lentezza (4 o 5 giorni). Di più si osserva inappetenza, tristezza, aumento di temperatura che può arrivare fino a 2 gradi, e dura ordinariamente solo un pajo di giorni. Quando l'animale è ritornato nelle condizioni normali si pratica allora la seconda inoculazione di 80 centigr. in 800 cmc. di solvente. I fenomeni locali e generali sono intensi parimente dopo la seconda iniezione, peraltro scompaiono più sollecitamente. La terza, quarta e quinta saranno rispettivamente di 100, 150 e 80 centigr., dosi enormi, se si pensa che per ottenere 1 gr. di vaccino secco necessitano circa 25 culture in boccette di spirito. Calcolando in dieci giorni l'intervallo fra una iniezione e l'altra e facendo il salasso dieci giorni dopo l'ultima crediamo che in soli due mesi di trattamento un cavallo può somministrare un siero molto efficace contro la peste bubbonica. Se la preparazione non è molto urgente si possono distanziare un poco di più le iniezioni.

Molto più efficaci sono le iniezioni endovenose ed il siero di cavallo così trattato è più attivo, però vi è il pericolo di una trombosi vasale, dovuta alla proprietà che ha questo siero come

tutti gli altri nucleo-proteidi di produrre la coagulazione intravascolare del sangue.

Si possono senza imbarazzo, con un po' di precauzione e con una rigorosa tecnica, evitare i pericoli inerenti alla sostanza da iniettare ed alla stessa iniezione. Prima della iniezione endovenosa si somministra al cavallo tre dosi di acido citrico di 20 a 25 grammi ognuna, con un intervallo di sei ore.

Sei ore dopo l'ultima dose si fa l'iniezione introducendo nella giugulare una cannula larga e grossa (15-20 cmc.) in comunicazione col recipiente (irrigatore comune di vetro sterilizzato) che contiene la soluzione di vaccino filtrato per carta e scaldata a 38 gradi.

Questa soluzione deve essere preparata il giorno avanti della iniezione e filtrata in due o tre palloni sterilizzati nell'autoclave, insieme col suo corrispondente imbuto, filtro ed un cappello di latta che chiude perfettamente l'imbuto. Questa, come si capisce, serve per evitare l'inquinamento del liquido, inquinamento che d'altra parte non si produce facilmente quantunque non si impieghi una tecnica rigorosa perchè la soluzione del vaccino ha un mezzo assolutamente disadatto alla riproduzione dei microrganismi ed è così per il potere proteolitico che detto vaccino possiede.

Per quello che si riferisce alla scelta del cavallo, questo deve essere di piccola statura, robusto e giovane (3-4 anni). Vi sono cavalli che non servono assolutamente a questo scopo, del che ci si accorge quando col ripetere le iniezioni si ha la reazione di eguale intensità delle prime, infiacchendosi e tornando con gran lentezza alla condizione di salute. Tenendo presente tutti questi inconvenienti è ben fatto iniettare più di un cavallo per non accorgersi troppo tardi che si è perduto il tempo senza alcuna utilità, e ciò tanto più che fra i cavalli che tollerano bene le iniezioni di vaccino ve ne sono alcuni che dànno un siero ottimo e altri che lo dànno appena mediocre, come avviene per gli altri sieri.

Le iniezioni debbono essere sottocutanee, nella regione del costato, qualche centimetro al di sotto della scapola per evitare all'animale la semi-immobilità della gamba che deriverebbe dalla formazione dell'edema se la iniezione si facesse nella spalla.

Fatto il salasso, si lascia che l'animale si rimetta e si fa una iniezione o due di 80-100 centim. ognuna avanti di procedere ad un nuovo salasso.

Non ho avuto occasione di sperimentare sull'uomo il siero da me preparato col metodo Lustig-Galeotti perchè non avevo pur anche finito il trattamento dei cavalli che già la piccola epide mia di S. Nicola si era estinta. Penso di eseguire negli animali una serie di esperienze comparative fra il siero Yersin rimesso dall'istituto Pasteur e quello che preparo qui col metodo Lustig-Galeotti, esperienze che riferirò in una prossima pubblicazione insieme a quelle che ho già cominciato col vaccino Haffkine.

Per quello che si riferisce al meccanismo di azione del siero e all'azione del nucleo-proteico pestoso sopra la circolazione, respirazione, il lettore consulti i numerosi lavori pubblicati su questo argomento dai professori Lustig-Galeotti.

La Plata, 10 marzo 1901.